





Isolation of cellular material under microscopic visualization using an adhesive/extraction reagent tipped probe

Patent number: DE69510925T
Publication date: 2000-02-17
Inventor: LIOTTA LANCE (US); ZHUANG ZHENPING (US); BUCK MICHAEL (US); STETLER-STEVENSON WILLIAM (US); LUBENSKY IRINA (US); ROTH MARK (US)
Applicant: US HEALTH (US)
Classification:
- International: **C12M1/26; C12M1/34; G01N1/28; G01N15/14; G01N33/50; G02B21/32; G01N1/02; G01N1/04; G01N1/08; G01N1/31; G01N35/00; C12M1/26; C12M1/34; G01N1/28; G01N15/14; G01N33/50; G02B21/32; G01N1/02; G01N1/04; G01N1/30; G01N35/00; (IPC1-7): G01N1/28; G01N33/483; G02B21/32**
- european: **G02B21/32; C12M1/26; C12M1/34H; G01N1/28F; G01N1/28M; G01N33/50**
Application number: DE19956010925T 19950301
Priority number(s): US19940203780 19940301; WO1995US02432 19950301

Also published as:
 WO9523960 (A1)
 EP0748439 (A1)
 US5843644 (A1)
 EP0748439 (B1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE69510925T

Abstract of corresponding document: **US5843644**

A method of direct extraction of cellular material from a tissue sample which involves: forming an image field of cells of the tissue sample utilizing a microscope, identifying at least one zone of cells of interest from the image field of cells which at least one zone of cells of interest includes different types of cells than adjacent zones of cells, and extracting the at least one zone of cells of interest from the tissue sample. The extracted zone(s) of cells is subjected to analysis. The overall process of identifying, extracting, transporting, and analyzing the extracted zones(s) of cells can be fully automated.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

⑨7 **EP 0 748 439 B 1**

⑩ **DE 695 10 925 T 2**

⑥1 Int. Cl. 7:
G 01 N 1/28
G 02 B 21/32
G 01 N 33/483

DE 695 10 925 T 2

- | | | |
|----|---|----------------|
| ②1 | Deutsches Aktenzeichen: | 695 10 925.1 |
| ③6 | PCT-Aktenzeichen: | PCT/US95/02432 |
| ⑤5 | Europäisches Aktenzeichen: | 95 911 965.2 |
| ⑧7 | PCT-Veröffentlichungs-Nr.: | WO 95/23960 |
| ⑤5 | PCT-Anmeldetag: | 1. 3. 1995 |
| ⑧7 | Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: | 8. 9. 1995 |
| ⑧7 | Erstveröffentlichung durch das EPA: | 18. 12. 1996 |
| ⑧7 | Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: | 21. 7. 1999 |
| ④7 | Veröffentlichungstag im Patentblatt: | 17. 2. 2000 |

③0 Unionspriorität:
203780 01. 03. 1994 US

⑦3 Patentinhaber:
Government of the United States, represented by
the Secretary of the Department of Health and
Human Services, Washington, D.C., US

⑦4 Vertreter:
Spott Weinmiller & Partner, 80336 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,
NL, PT, SE

⑦2 Erfinder:
LIOTTA, Lance, A., Potomac, MD 20854, US;
ZHUANG, Zhenping, Rockville, MD 20852, US;
BUCK, Michael, R., Bethesda, MD 20814, US;
STETLER-STEVENSON, William, G., Kensington,
Maryland 20895, US; LUBENSKY, Irina, A., Silver
Spring, MD 20906, US; ROTH, Mark, J., Silver
Spring, MD 20904, US

⑤4 **ISOLIERUNG VON ZELLMATERIAL MITTELS MIKROSKOPISCHER DARSTELLUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 695 10 925 T 2

0748439

18.10.99

- 1. -

BeschreibungTechnisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Analyse von Zellproben. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren und Vorrichtungen zur Mikrodissektion und Analyse von Zellproben, die in Verbindung mit einer Anzahl verschiedener Techniken verwendet werden können, die die Analyse von Enzymen, mRNA und DNA aus reinen Populationen oder Subpopulationen bestimmter Zelltypen ermöglichen.

Technologischer Hintergrund

Viele Krankheiten werden heute auf molekularer und genetischer Ebene verstanden. Die Analyse solcher Moleküle ist wichtig für die Krankheitsdiagnose und -prognose. Frühere Verfahren zur direkten Extraktion von Zellgewebematerial aus einer Gewebeprobe sind begrenzt, weil die Extraktion nur den durchschnittlichen Gehalt von krankheitsassoziierten Markern widerspiegelt. In der Realität sind Gewebe sehr heterogen, und die meisten diagnostischen Teile des Gewebes können auf ein paar hundert Zellen oder weniger in einer Läsion begrenzt sein.

Die molekulare Untersuchung von Human-Tumoren ist derzeit durch die Techniken und Modellsysteme, die für ihre Charakterisierung zur Verfügung stehen, begrenzt. Untersuchungen zur quantitativen oder qualitativen Beurteilung von Proteinen oder Nucleinsäureexpression in Human-Tumorzellen werden durch diverse Zellpopulationen, die in Bulk-Tumorproben vorhanden sind, erschwert. Histologische Felder invasiver Tumoren zeigen typischerweise eine Anzahl von Zelltypen, einschließlich Tumorzellen, Stromazellen, Endothelzellen, normaler Epithelzellen und Inflammations-Zellen. Da die Tumorzellen oft einen relativ geringen Prozentsatz der gesamten Zellpopulation ausmachen, ist es schwierig, die Bedeutung eines Netto-Proteins oder von Nucleinsäureveränderungen in diesen Proben zu interpretieren.

Die Prozesse der Tumordinvasion und Metastasenbildung hängen von einer erhöhten proteolytischen Aktivität der eindringenden Tumorzellen ab. Matrix-Metallproteinasen, die Kathepsine B, D und L, und Plasminogen-Aktivator wurden in der Metastasenkaskade impliziert. Es wurde angenommen, daß Kathepsin D ein unabhängiger Marker für die Prognose bei Brustkrebs ist. Mehrere korrelierende Beweisführungen unterstützen das Konzept, daß

19.10.99

- 2 -

Proteasen bei der Tumor-Invasion eine wichtige Rolle spielen, einschließlich: eine erhöhte Protease-Aktivität und/oder eine veränderte subzelluläre Verteilung von Proteasen in stark metastasierenden Tumorzelllinien, verstärkte Protease-Expression in invasiven Human-Tumoren, wie mittels Immunohistochemie als auch Untersuchungen von Tumorgewebe-Homogenaten festgestellt, und erhöhte mRNA-Spiegel bei Human-Tumoren. Alle diese Techniken haben wichtige Informationen betreffend die Protease-Expression bei Human-Tumoren geliefert, sie haben jedoch keinen definitiven Beweis dafür geliefert, daß Proteasen in spezifischen Regionen, in welchen eine Tumordinvasion stattfindet, vermehrt vorkommen.

Mit Untersuchungen von Human-Tumorzellen in Kultur sind die komplexen Wechselwirkungen der Tumorzellen mit Wirtszellen und extrazellulärer Matrix nicht belegbar, und nicht nachweisbar, wie sie die Tumorzellprotease-Produktivität oder -Aktivierung regulieren könnten. Die immunohistochemische Färbung ermöglicht es, die Enzymverteilung in Bereichen der Tumordinvasion zu untersuchen, doch sind die Ergebnisse je nach Gewebefixierung und Antikörper-Antigen-Affinität verschieden und ergeben nur eine semiquantitative Beurteilung der Proteasmengen. Weiters ist die quantitative Interpretation der Färbungsergebnisse wegen der Veränderlichkeit der Färbungsmuster innerhalb der Gewebeschnitte, der subjektiven Beurteilung der Färbungsintensität und der Schwierigkeit bei der Interpretation der Bedeutung von Stroma-Färbung kompliziert. Außerdem unterscheiden viele bei der Untersuchung von Proteasen verwendete Antikörper das Proenzym nicht vom aktiven Enzym-Spezies. Untersuchungen der Enzym- oder mRNA-Mengen aus Homogenaten von Human-Tumoren geben weder einen Aufschluß über die Mischpopulationen der Zellen innerhalb der Probe, noch über die begleitenden pathophysiologischen Prozesse, die möglicherweise im Gewebe ablaufen.

Die vorliegende Erfindung ist auf eine Probennahme-Technik zur Mikrodissektion von Zellgewebe gerichtet, die eine Untersuchung spezifischer histologischer Felder und Zellpopulationen innerhalb dieser Felder ermöglicht.

Die EP-A-0 539 888 betrifft eine Vorrichtung zur Auswahl von Zellen u. dgl.: zuerst werden Zellen u. dgl. auf einem Trägerelement in einer einzigen Schicht angeordnet. Ein Detektor detektiert dann jede optische Eigenschaft der Zellen u.dgl., und

Detektoren detektieren jede Position der Zellen u.dgl. in bezug auf die Struktur. Die durch die Detektoren erhaltenen Daten werden in einer Speichervorrichtung gespeichert. Gemäß den gespeicherten Daten bewegt eine Steuereinrichtung ein Greif-Element in den dreidimensionalen Richtungen relativ zum Trägerelement. Das Greif-Element erfaßt irgendwelche der Zellen u.dgl., die eine spezifische optische Eigenschaft haben, über ein Klebemittel. Jede der spezifischen Zellen u.dgl., die am Greif-Element haftet, ist vom Greif-Element lösbar. Dieses Dokument lehrt keine direkte Extraktion von Zellmaterial aus einer Gewebeprobe. Eine derartige Probe stellt jedoch Probleme dar, die beim Referenz-Verfahren nicht angetroffen werden. Weiters legt dieses Dokument einen Schritt des Analysierens des extrahierten Zellmaterials auf molekularer Ebene nicht nahe.

Das deutsche Patent DE-B 1 074 885 betrifft ein Verfahren zur Auswahl von Mikrofossilien aus Sedimenten oder fein zermahlenem Gestein.

Das US-Patent US-A-4 749 868 betrifft ein Verfahren zur Verarbeitung einer wasserhältigen Probe unter einem Scan-Elektronenmikroskop und eine Vorrichtung: Fragmente werden aus einer rohen, wasserhältigen Probe, wie einem an einer Pflanze haftenden Pilz, extrahiert. Die Probe wird rasch gefroren und unter Vakuum größtenteils beliebig zerschnitten. In der Probe enthaltenes Wasser wird sublimiert, und die Probe wird mit leitfähigem Material überzogen. Während die Probe mittels eines Scan-Elektronenmikroskops betrachtet wird, werden nützliche Fragmente mit einem Mikromanipulator aus der Probe extrahiert. Dieses Dokument ist jedoch auf die Verwendung einer "Nadel" gerichtet, und außerdem lehrt dieses Dokument keine Analyse auf molekularer Ebene und legt diese auch nicht nahe.

Offenbarung der Erfindung

Demgemäß ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Identifizierung spezifischer Zellen in einer Zellgewebeprobe vorzusehen.

Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur direkten Extraktion spezifischer Zellen aus einer Zellgewebeprobe vorzusehen.

Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein automatisiertes Verfahren zur Identifizierung spezifischer

Zellen in einer Zellgewebeprobe vorzusehen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein automatisiertes Verfahren zur direkten Extraktion spezifischer Zellen aus einer Zellgewebeprobe vorzusehen.

Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zum Erhalt reiner Zellpopulationen aus einer Zellgewebeprobe vorzusehen.

Gemäß diesen und weiteren Zielen der vorliegenden Erfindung, die im Verlauf der Beschreibung offenbar werden, sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur direkten Extraktion von Zellmaterial aus einer Gewebeprobe vor, welches umfaßt:

a) das Vorsehen einer auf einem Objektträger angebrachten Gewebeprobe mit einer Vielzahl von Zonen von Zellen;

b) die Bildung eines Bildfeldes von Zellen dieser Gewebeprobe unter Verwendung eines Mikroskops;

c) das Identifizieren mindestens einer Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, in diesem Bildfeld der Zellen, wobei die mindestens eine Zone der Zellen, an welchen ein Interesse besteht, eine andere Zellart aufweist als eine benachbarte Zone von Zellen;

d) das Extrahieren dieser mindestens einen Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, aus dieser Gewebeprobe durch Mikrodissektion durch:

d1) i) Kontaktieren der mindestens einen Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, mit einer an der Spitze mit Klebstoff versehenen Sonde, die einen Kontaktflächenbereich hat, der gleich oder nicht größer als ein Flächenbereich der mindestens einen Zone von Zellen ist, an welchen ein Interesse besteht, wobei die relative Klebestärke des Klebstoffs an der Spitze dieser Sonde größer ist als die Klebestärke der einen Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, auf dem Objektträger; und nachfolgendes

d1) ii) Zurückziehen der an der Spitze mit Klebstoff versehenen Sonde aus der Position des Kontakts mit der Gewebeprobe, wodurch bewirkt wird, daß die mindestens eine Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, im Bildfeld der Zellen, die am Kontaktflächenbereich der an der Spitze mit Klebstoff versehenen Sonde haften, durch Mikrodissektion weggezogen werden; bevor schließlich

e) die extrahierte mindestens eine Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, analysiert wird.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die vorliegende Erfindung wird unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben, die lediglich als nicht-einschränkende Beispiele angeführt sind, worin:

Fig. 1 ein Funktions-Systemsschema ist, welches zeigt, wie eine Gewebeprobe mikroskopisch als Bild dargestellt wird, auf einem Display-Monitor gezeigt wird, und wie ein Bereich der als Bild dargestellten Probe für eine nachfolgende Mikrodissektion und Analyse ausgewählt und identifiziert wird;

Fig. 2a-2c eine Reihe von Funktions-Systemsschemata sind, die zeigen, wie eine Zone einer Gewebeprobe gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung aus der auf einem Objektträger angebrachten Gewebeprobe extrahiert wird;

Fig. 3 eine schematische Darstellung einer alternativen Vorrichtung zum Extrahieren von Proben-Zonen aus der auf einem Objektträger angebrachten Gewebeprobe ist;

Fig. 4a und 4b schematische Darstellungen eines manuellen Extraktionsgerätsmanipulators sind, welcher zusammen mit der Extraktions-Vorrichtung der Fig. 3 gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann;

Fig. 5 ein Funktions-Systemsschema ist, welches zeigt, wie eine Zone des Probengewebes zu einem geeigneten Analyse-Protokoll geleitet werden kann;

Fig. 6a und 6b die Expression von MMP-2 in zehn Fällen von invasivem Kolonkarzinom (Fig. 6a) und in fünf Fällen von invasivem Brustkarzinom (Fig. 6b) im Vergleich zu normaler Kolon-Schleimhaut derselben Patienten zeigen;

Fig. 7 die SSCP-Analyse der MMP-2-Aktivierungsstelle zeigt.

Beste Art der Durchführung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Analyse von Zellmaterial auf molekularer oder genetischer Ebene gerichtet, bei welchem: ein Feld von Zellen in einer Gewebeprobe unter einem Mikroskop sichtbar gemacht wird, ein identifiziertes Gebiet mit einer Oberfläche in Kontakt gebracht wird, welche gleichzeitig ein Zellmaterial, an dem ein Interesse besteht, löst, extrahiert und/oder festhält, und das Zellmaterial, an dem Interesse besteht, zu einem geeigneten Analysesystem transfe-

18.10.99

- 6 -

riert wird. Die vorliegende Erfindung ist insbesondere auf die Analyse von lokalen Gewebsenzymen, Antigenen, DNA, RNA u.dgl. anwendbar.

Die vorliegende Erfindung ist auch auf ein vollautomatisiertes System gerichtet, mit welchem ein Gewebe auf einem Bildschirm sichtbar gemacht werden kann, so daß ein präzises Feld von Zellen, an dem ein Interesse besteht, durch verschiedene Markierungen identifiziert und abgegrenzt werden kann, um danach automatisch extrahiert und analysiert zu werden.

Fig. 1 ist ein Funktions-Systemschema, welches zeigt, wie eine Gewebeprobe mikroskopisch als Bild dargestellt wird, auf einem Display-Monitor gezeigt wird, und wie ein Bereich der als Bild dargestellten Probe für eine nachfolgende Mikrodissektion und Analyse ausgewählt und identifiziert wird. Wie in Fig. 1 dargestellt, wird eine Gewebeprobe 1 auf einem Glas-Objektträger 2 zur mikroskopischen Untersuchung und bildlichen Darstellung vorgesehen. Das Probengewebe 1 kann auf dem Glas-Objektträger 2 gemäß jeder herkömmlichen Methode, einschließlich Befestigung auf dem Glas-Objektträger 2 mit einem Agarose-Gel, Fixieren der Gewebeprobe in Paraffin etc. fixiert werden.

Der Glas-Objektträger 2 mit dem darauf angebrachten Proben-gewebe 1 wird auf den Tisch eines Mikroskops gegeben. Das Mikroskop, allgemein mit dem Bezugszeichen 3 bezeichnet, empfängt ein Bild der Gewebeprobe 1. Eine (nicht dargestellte) Videokamera ist mit dem Mikroskop 3 verbunden. Die Videokamera empfängt das Bild des Probengewebes 1 vom Mikroskop 3 und zeigt das Bild der Gewebeprobe auf einem Display-Monitor 4 an.

Das Bild des Probengewebes 1 ist auf das "Feld" des Mikroskops 3 für irgendein gegebenes Bild begrenzt. Wie in Fig. 1 angezeigt, kann das Feld des Probengewebebildes mehrere Zonen, "A", "B", "C" und "D" verschiedener Zellarten inkludieren, die durch Verwendung von geeigneter (geeigneten) Farbe(n) zum Färben der Gewebeprobe optisch unterschieden werden können. Als Beispiel wird in den Fig. 1 und 2a-2c angenommen, daß die Zone "B" die Zone des Zellmaterials ist, an der ein Interesse besteht. Das Bild auf dem Display-Monitor 4 wird von der Bedienungsperson verwendet, um eine oder mehrere Zonen der Gewebeprobe 1, an der ein Interesse besteht, auszuwählen. Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betätigt die Bedienungsperson, nach-

dem die Zone(n), an der (denen) ein Interesse besteht, ausgewählt und identifiziert wurde(n), manuell eine Vorrichtung zum Extrahieren der identifizierten Zone(n) vom Glas-Objektträger 2. Die extrahierte(n) Zonen(n) des Probenmaterials können entweder eine Analysen-Probe inkludieren. Andernfalls kann (können) die identifizierte(n) und extrahierte(n) Zone(n) Zonen inkludieren, die zu verwerfen sind, und die übrige(n) Zone(n), die auf dem Glas-Objektträger 2 zurückbehalten werden, können später analysiert werden.

Zusätzlich zur manuellen Betätigung, die nachstehend genauer besprochen wird, ist es möglich, gemäß einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung das Bild auf dem Display-Monitor 4 zu verwenden, um (eine) Probenzone(n) auszuwählen und zu identifizieren, deren relative Position unter Verwendung eines Computers bestimmt wird, welcher ein digitalisiertes Signal des Bildes von der Videokamera (oder dem Mikroskop) erhält, und welche eine Referenz-Position auf dem Tisch des Mikroskops 3, auf dem die Probe gehalten wird, erhält. Solche Positionierungsdetektions- und Erkennungssysteme sind auf diesem Gebiet herkömmlich und können leicht angewendet werden, um das Proben-Präparationsverfahren der vorliegenden Erfindung zu automatisieren. Bei dieser automatisierten Ausführungsform der Erfindung kann der Computer, der die Positionierungsdetektion und Erkennung durchführt, auch dazu verwendet werden, die Bewegung der nachstehend besprochenen Vorrichtungen, die zum Extrahieren von Gewebezonen verwendet werden, zu steuern, womit die Probenentnahme automatisiert wird. Außerdem kann das Bild der Probe elektronisch abgetastet werden, um Zonen mit einem vorbestimmten oder relevanten Färbungsgrad automatisch zu identifizieren, wobei bekannte Techniken und Vorrichtungen verwendet werden. Somit könnte bei einer bevorzugten Ausführungsform ein Computer verwendet werden, um Zonen, an denen ein Interesse besteht, und die relative Position solcher Zonen auszuwählen und zu identifizieren, um eine Vorrichtung zum Entfernen solcher Zonen auf automatisierte Weise zu betätigen.

Die Fig. 2a-2c sind eine Reihe von Funktions-Systemsschemata, die zeigen, wie eine Zone einer Gewebeprobe 1 gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung aus der auf einem Objektträger angebrachten Gewebeprobe 1 extrahiert wird. Selbst-

18.10.99

- 8 -

verständlich könnten die in Fig. 2a-2c dargestellten Schritte entweder manuell von einer Bedienungsperson oder von einem Computer unter Verwendung herkömmlicher Positionier- und Steuerungsmethoden, z.B. Computer-gesteuerter Robotertechniken, durchgeführt werden.

Die in den Fig. 2a-2c dargestellte Ausführungsform der Erfindung verwendet eine Kontaktsonde 5, die an ihrer Spitze ein Klebstoff/Extraktionsreagens 6 aufweist. Ein geeignetes Klebstoff/Extraktionsreagens kann eine Mischung aus Piccolyt und Xylol inkludieren. In Fig. 2a wird die Kontaktsonde 5 entweder manuell oder mittels Computersteuerung so positioniert, daß sie über der zu extrahierenden Probenzone ("B") ist und mit dieser fluchtet. Wie aus Fig. 2a leicht verständlich ist, muß der Oberflächenbereich der Kontaktsondenspitze (und das Klebstoff/Extraktionsreagens) etwa gleich dem Oberflächenbereich der zu extrahierenden Zone sein und nicht größer als diese. Andernfalls kommt es zu einem übermäßigen Entfernen von benachbarten Gewebezonen.

Sobald die Spitze der Kontaktsonde 5 mit der zu extrahierenden Probenzone ("B") fluchtet, wird die Kontaktsonde 5 abgesenkt, so daß das Klebstoff/Extraktionsreagens 6 an der Spitze derselben mit der Probenzone in Kontakt kommt (Fig. 2b).

Das Klebstoff/Extraktionsreagens 6 wird so ausgewählt, daß es an der Probenzone leicht anhaftet. Sobald das Klebstoff/Extraktionsreagens 6 an der Spitze der Kontaktsonde 5 mit der Probenzone in Kontakt gelangt (Fig. 2b) und die Probenzone daran haftet, kann die Kontaktsonde 5 aus der (in Fig. 2b gezeigten) Kontaktposition zurückgezogen werden und wie in Fig. 2c gezeigt bewegt werden. Da die relative Adhäsionskraft des Klebstoff/Extraktionsreagens größer als die Adhäsionskraft ist, die zum Anbringen der Probe auf dem Glas-Objektträger verwendet wird, zieht die Kontaktsonde 5 die Probenzone "B" vom Glas-Objektträger weg, wenn sie ein- oder zurückgezogen wird. Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurde eine Glaspipette als Kontaktsonde 5 verwendet. Bei dieser Ausführungsform wurde die Spitze der Glaspipette mit einer Lösung aus Piccolyt (568g/l) und Xylol (437,5 g/l) überzogen, indem die Spitze der Glaspipette in die Piccolyt/Xylol-Lösung eingetaucht wurde.

Zusätzlich zum Entfernen der Probenzone vom Glas-Objektträ-

ger 2, kann die Kontaktsonde 5 verwendet werden, um die extrahierte Probenzone zu einem Analysebehälter 7 zu transferieren, wie in Fig. 2c gezeigt, oder zu irgend einem anderen Ort, wie einem Abfallbehälter, einem Kulturmedium usw., zu bringen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Kontaktsonde 5 verwendet, um die extrahierte Probenzone zum Probenaufnahmetisch eines automatisierten klinischen Analyse-Geräts zu bringen, das so gestaltet ist, daß es eine gewünschte Analyse der Probenzone durchführt. Es ist somit verständlich, daß die vorliegende Erfindung ein vollständig automatisiertes Verfahren und System zur Identifizierung von Probenzonen auf einer auf einem Objektträger angebrachten Probe, das Entfernen der Probenzonen, an denen ein Interesse besteht, von der am Objektträger angebrachten Probe, und das Transportieren der extrahierten Probenzonen zu einem automatisierten Analyse-Gerät, das eine automatisierte Analyse der extrahierten Probenzonen durchführen kann, vorsehen kann.

In Fig. 2c ist gezeigt, daß die extrahierte Probenzone in einem Behälter 7 abgegeben ist, der beispielsweise ein Teströhrchen oder ein ähnlicher Behälter sein kann, in welchem die Analyse der extrahierten Probenzone begonnen oder durchgeführt werden kann. Wie in Fig. 2c dargestellt, kann eine Reagenslösung 8, die alles oder einen gewünschten Bestandteil der extrahierten Probenzone von der Kontaktsondenspitze entfernt, in den Behälter 7 gegeben werden, bevor die extrahierte Probenzone hineingegeben wird. Beispielsweise kann im Falle einer DNA-Analyse eine Lösung aus Tris (50 mM, pH 8,5), EDTA (1 mM), Tween 20 (0,5%) und Proteinase K (0,2 mg/ml) verwendet werden, um die extrahierte Probenzone von der Spitze der Kontaktsonde 5 zu entfernen und das Gewebematerial für Analysezwecke zu lösen.

Zusätzlich zur in den Fig. 2a-2c gezeigten Kontaktsonde könnte auch eine hohle Saugsonde verwendet werden, um Probenzonen von der auf dem Objektträger angebrachten Gewebeprobe 1 zu extrahieren. Eine solche Saugsonde könnte mit einer scharfen ringförmigen Spitze versehen sein, mit welcher Probenzonen herausgestanzt und durch Saugkräfte extrahiert werden könnten.

Fig. 3 ist eine schematische Darstellung einer alternativen Vorrichtung zum Extrahieren von Probenzonen von einer auf einem Objektträger angebrachten Gewebeprobe 1. Die in Fig. 3 gezeigte Extraktionsvorrichtung 9 inkludiert eine Schneidklinge 10 und

einen Greifarm 11. Der Greifarm 11 kann in in bezug auf die Schneidklinge 10 entgegengesetzte Weise bewegt werden. Der Greifarm 11 ist in Fig. 3 in seiner geöffneten Position gezeigt. Der Greifarm 11 ist von der veranschaulichten geöffneten Position in eine geschlossene Position bewegbar, in welcher die Spitze des Greifarms 11 die Schneidklinge 10 berührt. Die Bewegung des Greifarms 11 kann durch ein Seil- und Rillenscheibensystem gesteuert werden, mit welchem bewirkt wird, daß der Greifarm 11 an seiner Basis schwenkt, indem ein Zug an ein Seil angelegt wird, das durch eine an der Basis des Greifarms 11 befindliche Rillenscheibe hindurchläuft. Der Zug auf das Seil kann durch Betätigung eines Hebels oder Niederdrücken eines Knopfes 12 an der Vorrichtung, die die Spannung an das Seil auf bekannte Weise angelegt hat, angelegt werden. Solche mechanische Betätigungsstrukturen sind auf dem Gebiet der Greifvorrichtungen bekannt.

Bei der Betätigung der Vorrichtung der Fig. 3 kann die Schneidklinge 10, die in bezug auf die Mittelachse der Vorrichtung in einem stumpfen Winkel steht, einen Teil der Gewebeprobe ausschneiden und herausheben, indem die Schneidklinge 10 auf einen Rand eines Teils der zu extrahierenden Gewebeprobe placiert wird und der Greifarm 11 dann in die geschlossene Position bewegt wird. Während der Greifarm 11 mit der Gewebeprobe in Kontakt gelangt, zieht er die Schneidklinge 10 in die Probe und drückt einen Teil der Probe zur Schneidklinge 10 hin und bewirkt dadurch, daß ein Teil der zwischen der Schneidklinge 10 und dem Greifarm 11 in Kontakt befindlichen Probe herausgeschnitten und aus der Probe herausgehoben wird.

Bei einer weiteren, alternativen Ausführungsform der Vorrichtung der Fig. 3 kann die Bewegung des Greifarms 11 durch ein Zahnrad anstelle einer Rillenscheibe und eine damit zusammenwirkende Zahnstange anstelle eines Seiles bewirkt werden. Solche mechanische Konstruktionen sind auf dem Gebiet der Greifvorrichtungen bekannt.

Die Fig. 4a und 4b sind schematische Darstellungen eines manuellen Extraktionsgerätmanipulators, der zusammen mit der Extraktionsvorrichtung der Fig. 3 gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann. In Fig. 4a ist der Extraktionsgerätmanipulator mit einer Basis 13 dargestellt, die mit einer

Klemmeinrichtung 14 zur entfernbaren Befestigung der Vorrichtung an einer Strebe oder einem Trägerteil des Tisches eines Mikroskops ausgerüstet ist (vgl. Fig. 4b). Der Klemm-Mechanismus inkludiert eine Klemmplatte 15, die an einer mit einem Gewinde versehenen Welle 16 befestigt ist, die durch eine mit einem Gewinde versehene Bohrung 17 in einem unteren Teil der Basis 13 hindurchtritt. Ein Festziehknopf 18 ist am Ende der mit einem Gewinde versehenen Welle 16 vorgesehen. Drehen des Festziehknopfes 18 bewirkt, daß sich die Klemmplatte 15 in bezug auf einen oberen Teil 19 der Basis 13 bewegt. Somit kann der Extraktionsgerätmanipulator an einem Teil des Tisches des Mikroskops 20 angeklemt werden, wie in Fig. 4b gezeigt, indem ein Streben- oder Stützteil 21 des Tisches des Mikroskops 20 zwischen der Klemmplatte 15 und dem oberen Teil 19 der Basis 13 positioniert wird und der Knopf 18 gedreht wird, um die Klemmplatte 15 am Streben- oder Stützteil 21 des Tisches des Mikroskops 20 festzuziehen.

Der Extraktionsgerätmanipulator inkludiert einen Geräthalter 22 mit einem darin befindlichen durchgehenden Loch 23 zur Aufnahme der Welle eines Extraktionsgerätes 24. Idealerweise sollte der Geräthalter 22 eine gedämpfte Vor- und Rückwärtsbewegung für das Extraktionsgerät ermöglichen. Daher enthält die durchgehende Bohrung 23 des Geräthalters 22 gemäß einer bevorzugten Ausführungsform eine Büchse, die mittels einer Gerätfeststellschraube 24 einstellbar gegen die Gerätwelle festgezogen werden kann.

Der Geräthalter 22 ist durch eine Stützwelle 25, die an gegenüberliegenden Enden durch gedämpfte 360° Drehgelenke 26 und 27 mit dem Geräthalter 22 und der Basis 13 verbunden ist, abgestützt. Die Länge der Stützwelle 25 zwischen den gedämpften 360° Drehgelenken 26 und 27 ist einstellbar. Die Einstellung der unabhängigen gedämpften 360° Drehgelenke 26 und 27 zusammen mit der verstellbaren Länge der Stützwelle 25 und der Position der Gerätwelle innerhalb der durchgehenden Bohrung 23 ermöglichen einen hohen Bewegungsgrad des Extraktionsgerätes in bezug auf eine auf einem Objektträger angebrachte Probe, die auf dem Tisch des Mikroskops positioniert ist. Daher kann eine Bedienungsperson ein vom Extraktionsgerätmanipulator gehaltenes Extraktionsgerät manipulieren und ausgewählte Gewebezonen von einer an

18.10.99

- 12 -

einem Objektträger angebrachten Gewebeprobe mit einem hohen Präzisionsgrad entfernen.

Fig. 5 ist ein Funktions-Systemschema, welches zeigt, wie eine Zone einer Gewebeprobe zu einem geeigneten Analyse-Protokoll geleitet werden kann. Wie in Fig. 5 gezeigt, kann eine Mikroextraktion einer Gewebeprobezone aus einer auf einem Objektträger angebrachten Gewebeprobe 1, wie oben besprochen, genommen und zu einer Proben-Präparationsstufe 28 transferiert werden, in welcher die Zellen, an welchen ein Interesse besteht, zwecks Analyse extrahiert und gesammelt werden können. Herausgeschnittene Zellen können in dieser Stufe auch solubilisiert werden. Wenn die Zellen, an denen ein Interesse besteht, DNA oder RNA enthalten, wird die extrahierte Probe gewünschtenfalls einer Polymerase-Kettenreaktions-(PCR)Amplifizierung und Hybridisierung, Strang-Konformationspolymorphie und Southern und Northern blotting unterzogen. Wenn die Zellen, an welchen ein Interesse besteht, Proteine enthalten, kann die extrahierte Probe einer Enzymzymographie, einem Immunoassay oder einem biochemischen Test unterzogen werden.

Die selektive Extraktion oder Mikrodissektion von Gefrier-gewebeschnitten gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht die Gewinnung und Analyse sowohl von aktiven Enzymen als auch von mRNA. Zusätzlich ist die aus diesen Schnitten gewonnene DNA im nativen Zustand und kann für Untersuchungen, wie DNA-Fingerprinting, verwendet werden. Die Mikrodissektion von in Paraffin eingebetteten Geweben gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht eine PCR-Amplifikation von DNA aus reinen Zellpopulationen, die weniger als ein Hochleistungsfeld darstellen, oder einer einzigen Schicht von Epithelzellen, die Zystenräume auskleiden.

Zur allgemeinen Präparation von Proben für Gefrierschnitt-Mikrodissektion gemäß der vorliegenden Erfindung können Mikrodissektions-Objektträger hergestellt werden, indem 1% Agarose auf einen Standard-Histologie-Objektträger gegeben wird und ein Deckglas darübergegeben wird. Nach einer kurzen Zeitspanne, beispielsweise 5 Minuten, wird das Deckglas entfernt, wobei ein dünnes Gel auf dem Objektträger zurückbleibt. Ein kleiner Gefriergewebeausschnitt, beispielsweise mit einer Dicke von 25 Mikron, wird auf das Agarosegel gegeben und kurz mit Eosin

gefärbt. Das Gewebe kann auch mit Mitteln zur Denaturierung von RNase behandelt werden, je nach der nachfolgenden Extraktionsmethode. Unter direkter mikroskopischer Sichtbarmachung wird die spezifische Zellpopulation oder Subpopulation, an der ein Interesse besteht, aus dem Gewebeschnitt unter Verwendung der oben besprochenen Techniken beschafft.

Zur Enzym-Analyse kann die beschaffte Gewebeprobe in einen geeigneten Puffer gegeben werden, je nach dem Enzym, an dem ein Interesse besteht. Die Enzymmengen können mittels mehrerer Methoden, einschließlich der Zymographie und der Verwendung spezifischer fluorometrischer Substrate gemessen werden. Die genauen Enzymexpressionsmengen in einer spezifischen Zellpopulation können bestimmt werden.

Für die messenger-RNA-Analyse kann die Gewebeprobe auf Agarose gegeben und nötigenfalls mit Mitteln zur Denaturierung von RNase behandelt werden. Die beschaffte Gewebeprobe wird sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Gewebe kann gleich verwendet oder mehrere Monate lang bei -70°C gelagert werden. Die mRNA kann unter Verwendung einer Oligo-dT-Säule (Micro-Fast track-mRNA-Isolation Kit, Invetrogen Co.). Die gewonnene mRNA der reinen Zellpopulationen kann unter Verwendung der PCR-Technologie amplifiziert und untersucht werden.

Für die DNA-Analyse kann die Gewebeprobe in einer einstufigen Extraktionspufferlösung von 50 mM Tris, pH 8,5; 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20 und 0,2 mg/ml Proteinase K gegeben und vier Stunden lang bei 37°C inkubiert werden, gefolgt von einer zehnminütigen Inkubation bei 95°C . Die gewonnene DNA kann mittels PCR-Technik amplifiziert und analysiert werden. Wenn native DNA für DNA-Fingerprinting benötigt wird, kann Proteinase K nach DNase zugegeben werden.

Zur Paraffinschnitt-Mikrodissektion werden routinemäßig in Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte nach Entparaffinierung und kurzer Färbung mit Eosin der Mikrodissektion unterzogen. Die Gewebeschnitte werden durch Direkt-Mikroskopie sichtbar gemacht, und Zellpopulationen oder Subpopulationen, an welchen ein Interesse besteht, werden unter Verwendung einer modifizierten Glaspipette mit der oben besprochenen Klebstoff-überzogenen Spitze beschafft. Mit diesem Verfahren können selbst Gewebeproben, die auch nur die Größe einer Zelle

haben, beschafft werden. Die Spezifität der Dissektion stellt eine bedeutende Verbesserung gegenüber derzeit bekannten Techniken dar.

Für die DNA-Analyse von in Paraffin eingebettetem Gewebe wird die Glaspipette mit der herausgeschnittenen Gewebeprobe in einer einstufigen Extraktionspufferlösung aus 50 mM Tris, pH 8,5; 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20 und 0,2 mg/ml Proteinase K gegeben, die das Gewebe von der Pipettenspitze entfernt. Je nach der Größe der Probe wird sie 2 bis 24 Stunden lang bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer zehnminütigen Inkubation bei 95°C. Die Glaspipettenspitze kann dann sterilisiert und wiederverwendet werden.

Merkmale und Charakteristika der vorliegenden Erfindung werden durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, auf welche die vorliegende Erfindung als nicht eingeschränkt angesehen werden soll. In den Beispielen und im ganzen Text sind die Prozentangaben Gewichtsprozent, sofern nicht etwas anderes angegeben ist.

Die folgenden Beispiele wurden durchgeführt bei einem Versuch um festzustellen, ob die vorliegende Erfindung verwendet werden könnte, um die Proteaseverteilung während einer Human-tumorinvasion genauer zu studieren. Die MMP 2- und Kathepsin B-Mengen in Feldern invasiver Brust- und Kolonkarzinome wurden gemessen, um zu beurteilen, ob die Enzyme in diesen Regionen im Vergleich zu entsprechenden Anzahlen normaler Zellen desselben Patienten mengenmäßig zugenommen hatten.

In den folgenden Beispielen wurden normale und Tumor-Proben von Kolon- und Brustgewebe aus chirurgischen Resektionen bis zur Analyse in gefrorenem Zustand (-70°C) gehalten. Gewebeschnitte von invasivem Brust- und Kolonkarzinom wurden aufgrund histologischer Evaluierung ausgewählt. Für die Tumorschnitte wurden histologische Gewebefelder, die invasiven Tumor und Stroma enthielten, ausgewählt, jedoch kein normales Epithel oder beträchtliche Mengen an Inflammations-Zellen. Die Kontrollschnitte von normalem Gewebe enthielten Epithel und einen dünnen Schnitt von darunterliegendem Stroma. Das Verhältnis von Epithel- und Stroma-Gewebe war sowohl für normale als auch für Tumorschnitte ähnlich.

In den Beispielen wurden Mikrodissektions-Objektträger zube-

reitet, indem Standard-Histologie-Objektträger mit 200 Mikroliter warmer Agarose (1%) bedeckt und ein Deckglas darübergelegt wurde. Nach fünf Minuten wurde das Deckglas entfernt, wobei ein dünnes Bett aus Agarose auf dem Objektträger zurückblieb. Gefrierschnitte mit einer Dicke von 20 Mikron wurden in einem Kryostat hergestellt und auf das Agarose-Gel gegeben. Das Gewebe wurde kurz in Eosin eingetaucht. Eine optimale Mikrodissektion wurde erreicht, indem man am Rande jedes Schnittes begann und systematisch histologische Felder, an denen ein Interesse bestand, mit der Mikrodissektionsvorrichtung der Fig. 3 herauschnitt und abtrennte. Gebiete, an welchen ein Interesse bestand, wurden auf dem Objektträger für eine nachfolgende Analyse zurückbehalten. Der DNA-Gehalt der Proben wurde mittels spektrophotometrischer Messung bei 260 nm bestimmt. Der DNA-Gehalt jeder Probe war proportional zur Anzahl der Zellen, die in jedem histologischen Schnitt gezählt wurden.

Beispiel 1

Bei diesem Beispiel wurden von jedem Probanden Proben von normalem und von Tumorgewebe, deren Zellenanzahl einander entsprach, analysiert. Die Mengen an MMP-2 wurden mittels Zymographie bestimmt und unter Verwendung eines Arcus-Scanners quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung des Student-t-Tests statistisch analysiert. Die Kathepsin B-Mengen wurden als V_{\max} gegen das Substrat Z-Arg-Arg-NHMeC bestimmt.

Die Ergebnisse dieses Beispiels sind nachstehend in Tabelle 1 angegeben, welche die Kathepsin B-Aktivität in einander entsprechenden Paaren von invasivem Kolonkarzinom/normalem Epithel und invasivem Brustkarzinom/normalem Epithel anführt. Aktivitätsmessungen sind als V_{\max} , nmol/min x mg DNA ausgedrückt. Die Kathepsin B-Aktivität war durchschnittlich 2,3fach bei den Kolontumoren ($p < 0,005$) und 6,9fach bei den Brusttumoren ($p = 0,077$) erhöht.

TABELLE 1

KATHEPSIN B-AKTIVITÄT BEI INVASIVEM HUMAN-KOLONKARZINOM			
PROBE	NORMAL	TUMOR	TUMOR/NORMAL
1	1,38	4,75	3,4
2	1,89	2,25	1,2
3	1,98	6,32	3,2
4	0,49	1,88	3,8
5	0,44	0,72	1,6
6	1,03	1,92	1,9
7	0,47	1,35	2,9
8	0,19	0,33	1,7
9	1,07	0,90	0,8
10	0,33	0,88	2,7
Durchschnitt	0,93	2,13	2,3
KATHEPSIN B-AKTIVITÄT BEI INVASIVEM HUMAN-BRUSTKARZINOM			
PROBE	NORMAL	TUMOR	TUMOR/NORMAL
1	0,63	3,02	4,8
2	0,51	10,08	19,8
3	0,61	4,43	7,3
4	2,21	2,38	1,1
5	2,06	3,72	1,8
Durchschnitt	1,20	4,73	6,9

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, zeigten alle fünf Brusttumoren und neun der zehn Kolontumoren eine erhöhte Kathepsin B-Aktivität im Vergleich zu entsprechenden Anzahlen normaler Zellen desselben Patienten (Tabelle 1). Die erhöhte Aktivität lag bei den Kolontumoren im Bereich von 19% bis 283%, mit einem durchschnittlichen Anstieg bei Tumoren von mehr als dem Zweifachen. Der Anstieg der Kathepsin B-Aktivität war bei Brusttumoren deutlicher, wobei der durchschnittliche Anstieg etwas weniger als siebenfach war.

Beispiel 2

Bei diesem Beispiel wurde eine Polymerasekettenreaktions-(PCR)-Analyse durchgeführt. Auf Basis der früher berichteten cDNA-Sequenzen von 72 kDa-Typ IV-Kollagenase wurden sense und

antisense-Oligonucleotid-Primer für die Amplifikation der Enzym-Aktivierungsstelle synthetisiert (M. Onisto et al., "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Phenotyping of Metalloproteinases and Inhibitors in Tumor Matrix Invasion", *Diagn. Mol. Pathol.*, 2(2):74-80, 1993). Die paarweisen Oligonucleotid-Sequenzen waren: 5'-CAA TAC CTG AAC ACC TTC TA, 3'-CTG TAT GTG ATC TGG TTC TTG. Markierte PCR für die Einzelstrang-Konformationspolymorphie (single strand conformation polymorphism, SSCP) wurde durch Vereinigung von Folgendem in einer 10 Mikroliter-Reaktionsmischung erhalten: 1 μ l 10XPCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,1% Gew./Vol. Gelatine); 1 μ l DNA-Extraktionspuffer; 50 pmol von jedem Primer; 20 nmol von jeweils dCTP, dGTP, dTTT und dATP; 0,2 μ l [³²P]dCTP (6000 Ci/mmol); und 0,1 Einheit Taq DNA Polymerase. Die Amplifizierungsreaktion wurde für 30 Zyklen bei 95°C 30 s lang, bei 60°C 30 s lang und bei 72°C 30 s lang durchgeführt.

Fig. 6a zeigt die Expression von MMP-2 in zehn Fällen von invasivem Kolonkarzinom im Vergleich zu normaler Kolonschleimhaut derselben Patienten. Die graphischen Blockdarstellungen zeigen einen Anstieg um das etwa Dreifache bei der 72 kDa-Pro-Form des Enzyms ($p < 0,001$) und um das Zehnfache bei der 62 kDa-Aktivform des Enzyms ($p < 0,001$).

Fig. 6b zeigt die Expression von MMP-2 in fünf Fällen von invasivem Brustkarzinom. Die graphischen Blockdarstellungen zeigen einen entsprechenden Anstieg um das Dreifache bei der 72 kDa Pro-Form des Enzyms ($p < 0,05$) und um das Zehnfache bei der 62 kDa-Aktivform des Enzyms ($p < 0,05$).

Die 72 kDa Pro-Typ IV-Kollagenase und die 62 kDa Aktivform des Enzyms war bei allen zehn Kolontumoren und allen fünf Brusttumoren im Vergleich zu normalem Gewebe desselben Patienten erhöht. Der Anstieg war bei der 62 kDa-Aktivform des Enzyms höher, welches durchschnittlich um das Zehnfache sowohl bei den Kolon- als auch bei den Brusttumoren im Vergleich zu normalem Kontrollgewebe erhöht war. Die Menge des 72 kDa Pro-Enzyms war durchschnittlich um das Dreifache bei beiden Tumortypen erhöht. Sowohl für die Brust- als auch für die Kolontumoren war der Anstieg des 62 kDa Aktiv-Enzyms variabler als der des Pro-Enzyms. Der Anstieg des 62 kDa Aktiv-Enzyms lag bei Tumoren im

Bereich vom Drei- bis Zwanzigfachen, während der Anstieg des 72 kDa-Pro-Enzyms durchgehend im Bereich des Zwei- bis Fünffachen lag. Diese Ergebnisse sind den Feststellungen von Davis et al. ("Activity of Type IV Collagenases in Benign and Malignant Breast Disease" Br. J. Cancer, 67:1126-1131, 1993) ähnlich, die diese kürzlich bei ihrer Analyse von Human-Brusttumoren machten. Diese Autoren führten eine Zymogramm-Analyse von Gewebeschnitten von menschlichen Brustkrebspatienten durch. Diese Analysen zeigten, daß die Fraktion des gesamten MMP-2, das als die 62 kDa Aktivierte Form anwesend war, bei bösartiger Erkrankung statistisch erhöht war, und ein hoher Anteil dieser aktiven Enzym-Spezies wurde bei Tumoren höheren Grades nachgewiesen. Die vorliegende Erfindung verlängert diese Analyse, indem sowohl 72 kDa- als auch 62 kDa-Formen des Enzyms in spezifischen Bereichen von invasivem Tumor und entsprechendem normalem Kontroll-Epithel desselben Patienten verglichen und quantifiziert wurden.

Beispiel 3:

Bei diesem Beispiel wurde eine Strang-Konformationspolymorphie-(SSCP)-Analyse durchgeführt. Markierte, amplifizierte DNA wurde mit einem gleichen Volumen von Formamid-Beladungsfarbe (95% Formamid; 20 mM EDTA; 0,05% Bromphenolblau und 0,05% Xylolzyanol) gemischt. Die Proben wurden 5 min lang bei 95°C denaturiert und auf ein Gel geladen, welches aus 6% Acrylamid (49:1 Acrylamid:bis), 5% Glyzerin und 0,6X TBE bestand. Die Proben wurden bei 8W, bei Raumtemperatur über Nacht der Elektrophorese unterzogen. Die Gels wurden auf 3 mm Whatman-Papier übertragen, getrocknet, und eine Autoradiographie wurde mit Kodak X-OMAT-Film durchgeführt.

Fig. 7 zeigt die SSCP-Analyse der MMP-2-Aktivierungsstelle. Die Figur zeigt repräsentative Fälle normaler Kolon-Schleimhaut im Vergleich zu invasivem Kolonkarzinom, und normales Brustgewebe im Vergleich zu invasivem Brustkarzinom. Es wird kein Unterschied festgestellt zwischen den normalen und den Tumorbproben. Die beiden Bande in jeder Spur repräsentieren Einzel- und Doppelformen von DNA. Ähnliche Ergebnisse wurden für zehn Kolonkarzinome und vier Brustkarzinome erhalten.

Um zu beurteilen, ob erhöhte Tumormengen von aktiviertem MMP-2 auf eine Mutation im Enzym zurückzuführen sind, wurde die

PCR verwendet, um die DNA zu amplifizieren, welche für die Aktivierungsstelle von Gelatinase A aus den Kolon- und Brusttumoren codiert. Die Aktivierungsstelle befindet sich 10 kDa vom N-Terminus des Enzyms entfernt und enthält die Spaltungsstelle, die das 72 kDa Pro-Enzym in die 62 kDa aktive Spezies überführt. Amplifizierung und Analyse dieses Bereichs mittels PCR und SSCP zeigten keine nachweisbaren Mutationen bei irgendeinem der zehn Kolontumoren und vier Brusttumoren, die untersucht wurden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die erhöhten Mengen an aktivem Enzym bei invasiven Tumoren höchstwahrscheinlich auf eine Tumor-assoziierte Aktivierungs-Spezies zurückzuführen ist. Es wurde festgestellt, daß die Empfindlichkeit der PCR-Amplifizierung der DNA aus der Mikrodissektion unterzogenen Gefriergewebeschnitten weniger als ein Hochleistungsfeld ist. Ähnlich der Amplifizierung der DNA wurde eine Amplifizierung von mRNA aus kleinen Zellpopulationen gemäß der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von Revers-PCR durchgeführt.

Eine frühere Untersuchung zeigte, daß MMP-2 beim Human-Kolonkarzinom vermehrt vorkommen. Kürzlich wurde jedoch bei mehreren Untersuchungen, bei welchen eine *in situ*-Hybridisierungsanalyse verwendet wurde, berichtet, daß die mRNA-Menge von MMP-2 bei Human-Kolonkarzinom in den Stroma-Zellen im Gegensatz zu den Tumorzellen erhöht ist. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden Gefriergewebeschnitte der Mikrodissektion unterzogen, um die Enzymmengen von MMP-2 in separaten Tumor- und Stroma-Zellpopulationen zu messen. Aus einem einzigen Hochleistungsfeld wurde genügend Gewebe gewonnen, um die Enzymmengen mittels Zymographie zu quantifizieren. Untersuchungen invasiver Tumorzellen und benachbarter Stroma aus drei Fällen zeigen an, daß die 72 kDa pro-MMP-2- und die aktive 62 kDa-Form sowohl mit Tumorzell- als auch mit Stroma-Zellpopulationen assoziiert sind. Vorläufige Daten deuten darauf hin, daß die größten Enzymmengen an der Tumor/Stroma-Schnittstelle vorhanden sind.

Die obigen Resultate zeigen an, daß die Mikrodissektion von Gefriergewebeschnitten eine spezifischere Analyse von Zellpopulationen in Human-Tumoren ermöglicht als herkömmliche Techniken. Die Mikrodissektion kann in Kombination mit einer Reihe verschiedener Techniken verwendet werden, die eine Analyse von Enzymen, mRNA und DNA aus reinen Populationen oder Sub-Popula-

tionen bestimmter Zelltypen ermöglichen. Diese einfache Technik kann bei der Charakterisierung der Proteaseverteilung während einer Human-Tumorinvasion nützlich sein, wobei die Protease-expression in Tumor- und/oder Stroma-Zellpopulationen als Indikator für die Aggressivität des Tumors genau bestimmt wird und die Wirksamkeit therapeutischer Anti-Protease-Mittel bei der Hemmung der Protease-Aktivität an der Tumor-Stroma-Schnittstelle überwacht wird. Außerdem kann eine Kombination dieser Mikrodissektionstechnik mit PCR, RT-PCR, Differential-Display und SSCP genetische Veränderungen bei spezifischen Sub-Populationen von Tumor- oder Stroma-Zellen identifizieren, die bei heterogenen Human-Tumorproben nicht offenbar wären.

Obwohl die vorliegende Erfindung unter Bezugnahme auf besondere Einrichtungen, Materialien und Ausführungsformen beschrieben wurde, kann der Fachmann aus der vorhergehenden Beschreibung die wesentlichen Charakteristika der vorliegenden Erfindung leicht erkennen, und verschiedene Änderungen und Modifizierungen können vorgenommen werden, um die verschiedenen Verwendungen und Charakteristika zu adaptieren ohne vom Bereich der vorliegenden Erfindung, wie er durch die nachfolgenden Patentansprüche beschrieben ist, abzuweichen.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur direkten Extraktion von Zellmaterial aus einer Gewebeprobe, umfassend:

a) das Vorsehen einer auf einem Objektträger angebrachten Gewebeprobe mit einer Vielzahl von Zonen von Zellen;

b) die Bildung eines Bildfeldes von Zellen dieser Gewebeprobe unter Verwendung eines Mikroskops;

c) das Identifizieren mindestens einer Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, in diesem Bildfeld der Zellen, wobei die mindestens eine Zone der Zellen, an welchen ein Interesse besteht, eine andere Zellart aufweist als eine benachbarte Zone von Zellen;

d) das Extrahieren dieser mindestens einen Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, aus dieser Gewebeprobe durch Mikrodissektion durch:

dl) i) Kontaktieren der mindestens einen Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, mit einer an der Spitze mit Klebstoff versehenen Sonde, die einen Kontaktflächenbereich hat, der gleich oder nicht größer als ein Flächenbereich der mindestens einen Zone von Zellen ist, an welchen ein Interesse besteht, wobei die relative Klebestärke des Klebstoffs an der Spitze dieser Sonde größer ist als die Klebestärke der einen Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, auf dem Objektträger; und nachfolgendes

dl) ii) Zurückziehen der an der Spitze mit Klebstoff versehenen Sonde aus der Position des Kontakts mit der Gewebeprobe, wodurch bewirkt wird, daß die mindestens eine Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, im Bildfeld der Zellen, die am Kontaktflächenbereich der an der Spitze mit Klebstoff versehenen Sonde haften, durch Mikrodissektion weggezogen werden; bevor schließlich

e) die extrahierte mindestens eine Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, analysiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Klebstoff ein Klebstoff/Extraktionsreagens ist, das eine Lösung von Piccolyt in Xylol umfaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die mindestens eine Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, eine Mehrzahl von Zellen derselben Art enthält.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, eine einzige Zelle enthält.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Extrahieren der mindestens einen Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, aus der Gewebeprobe automatisiert ist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Analysieren auf einem automatisierten Analysator durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die extrahierte Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, auf den automatischen Analysator transferiert wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die extrahierte Zone von Zellen im Hinblick auf Enzyme, Antigene, DNA oder RNA analysiert wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Bild auf einem Display-Monitor angezeigt wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Gewebeprobe vor der Bildung des Bildfeldes gefärbt wird und die Färbung zur Identifizierung der mindestens einen Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, im Bildfeld der Zellen verwendet wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die mindestens eine Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, im Bildfeld der Zellen durch ein automatisiertes Kontrast-Identifikationsverfahren identifiziert wird.
12. Verfahren zur direkten Extraktion von Zellmaterial aus

10.10.99

- 23 -

einer Gewebeprobe nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine Zone von Zellen, an welchen ein Interesse besteht, aus einem Mitglied ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus RNA, DNA und Proteinen besteht.

0 748 439

18.10.99

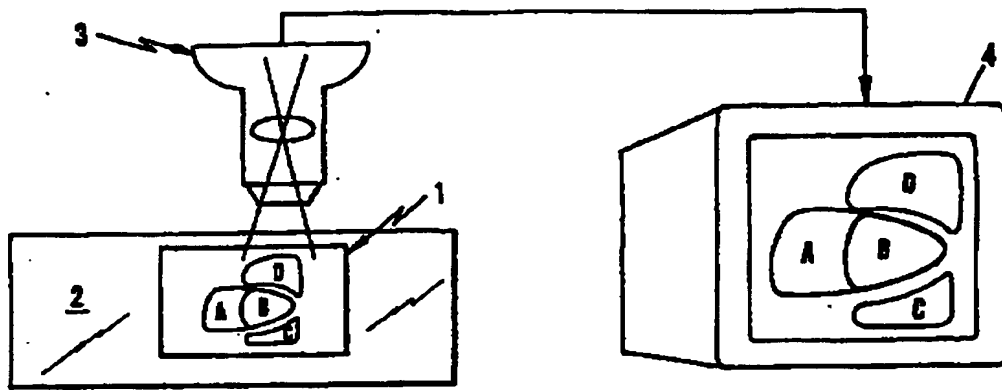


FIG. 1

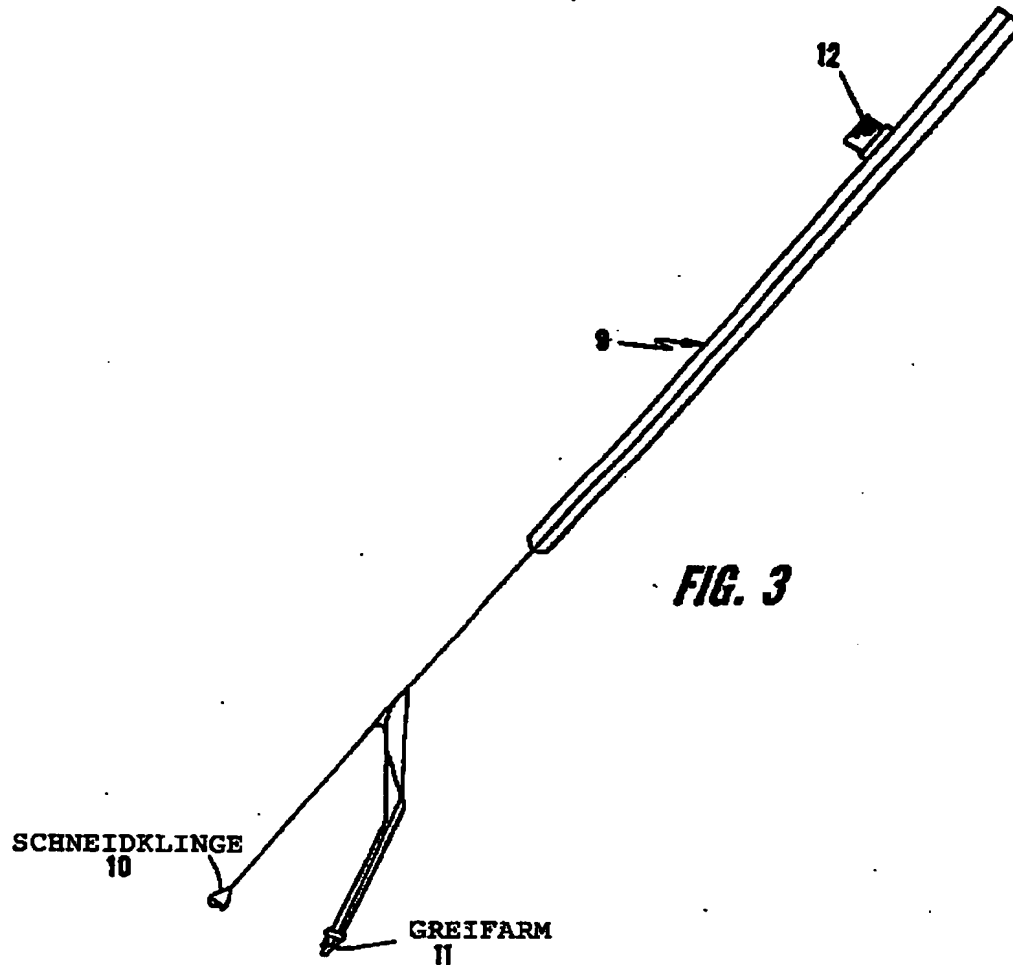
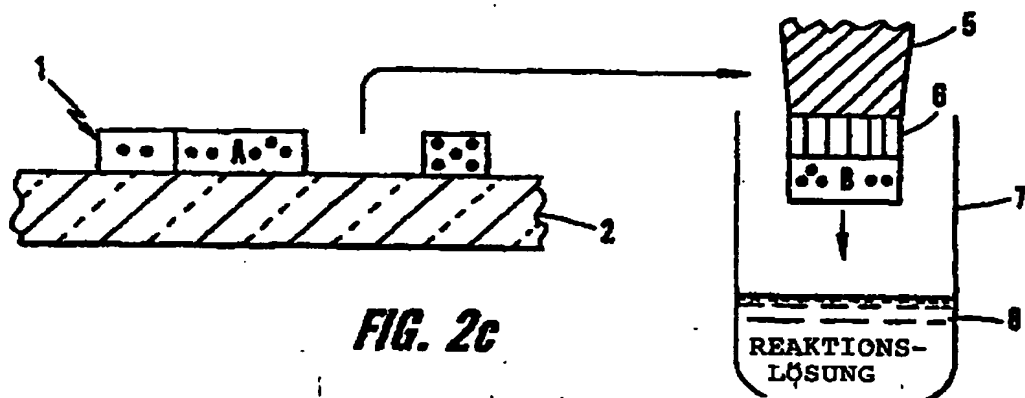
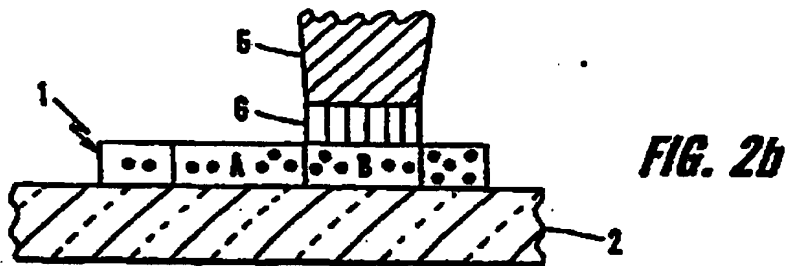
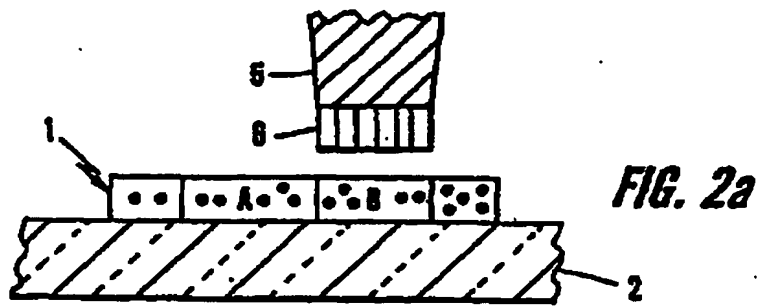
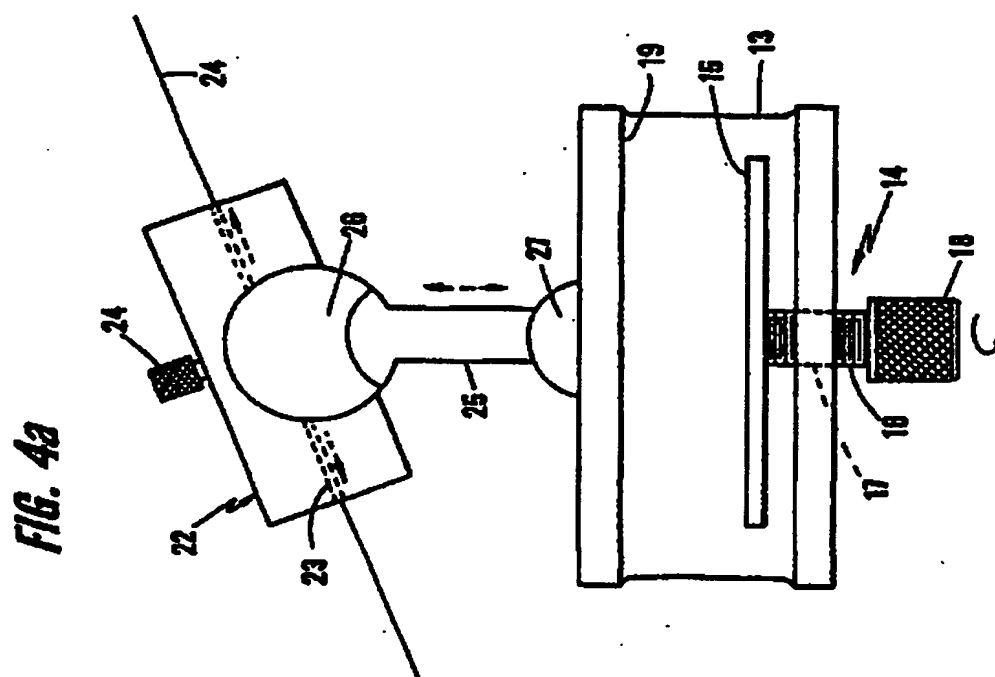
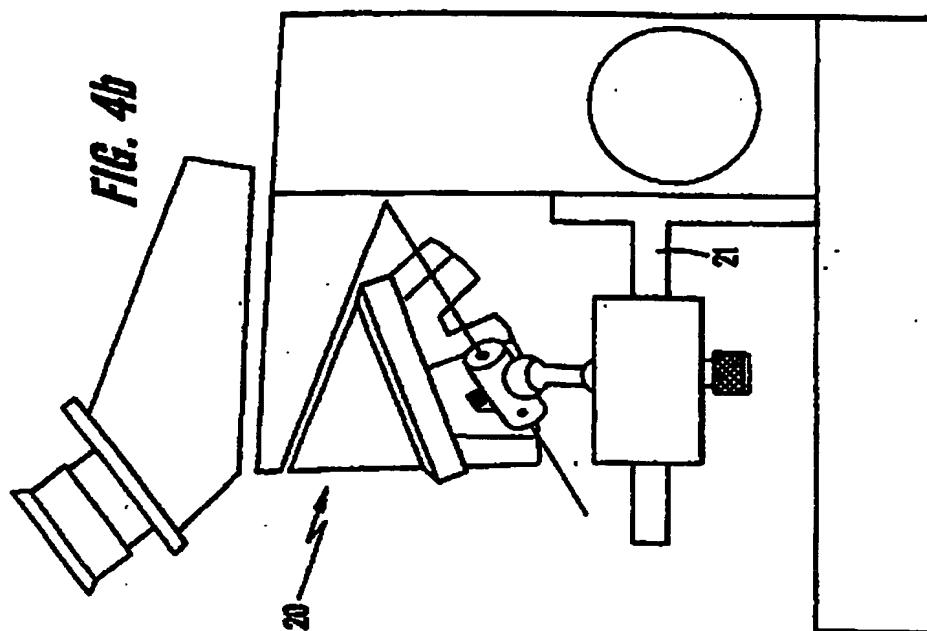


FIG. 3

18.10.99



18-10-99



MIKROSKOPISCHES GEBIET,
AN DEM INTERESSE BESTEHT

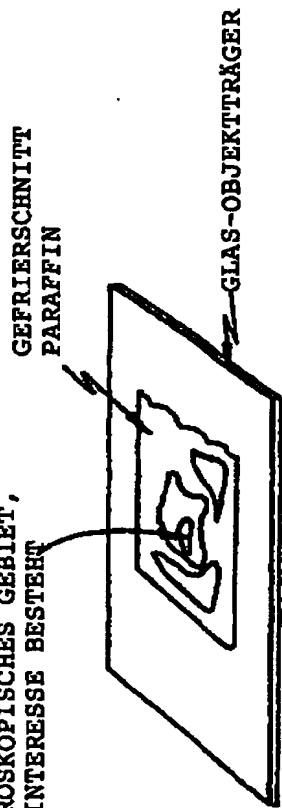
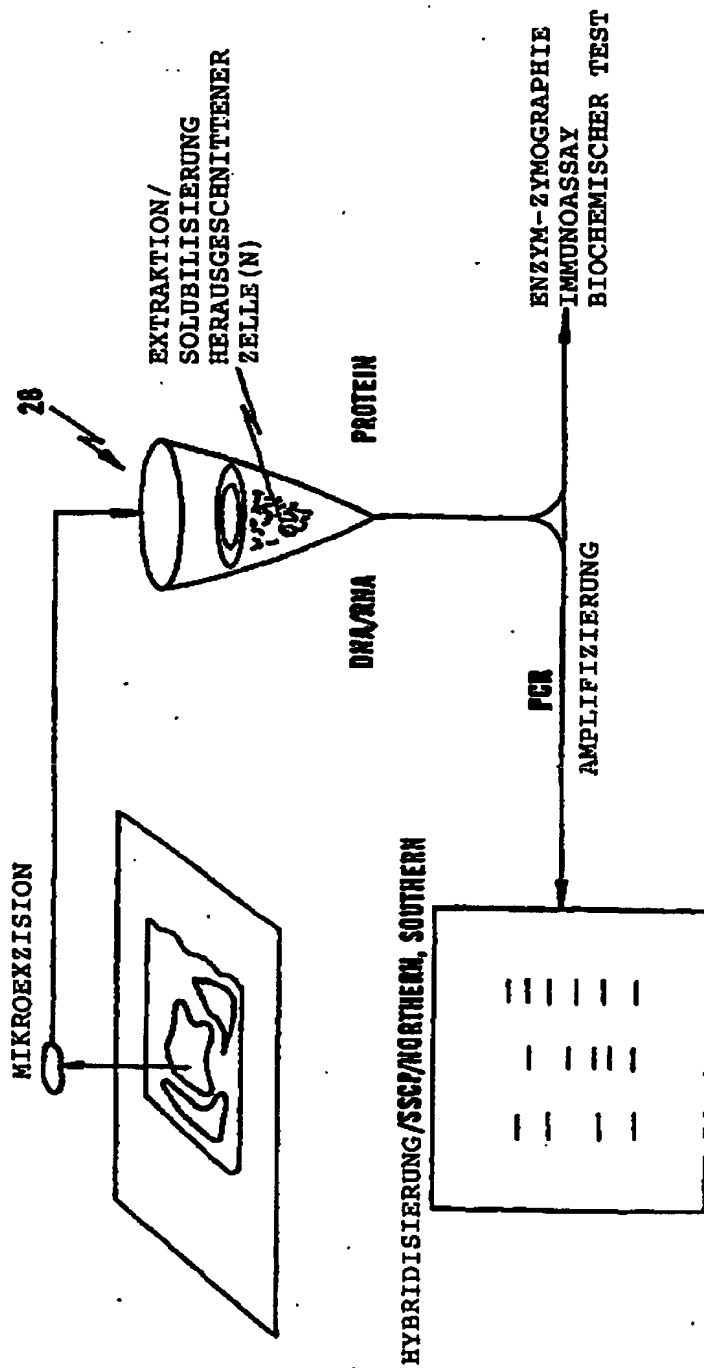


FIG. 5



19 00 99

18.10.99

FIG. 6a

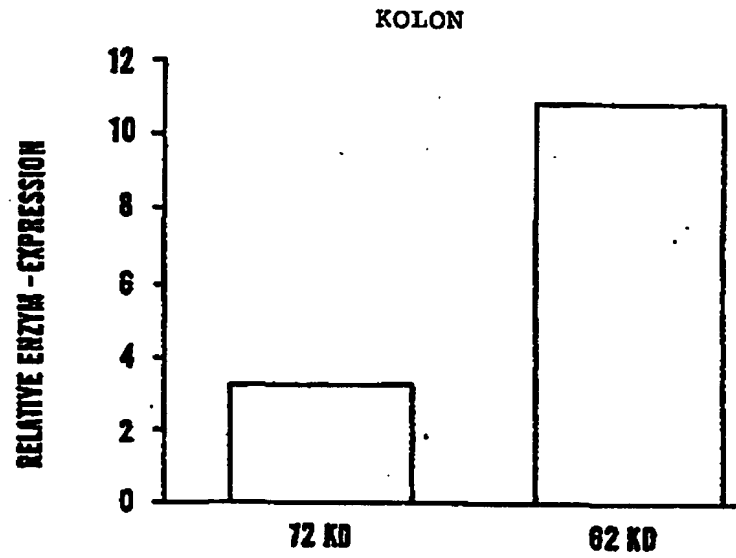
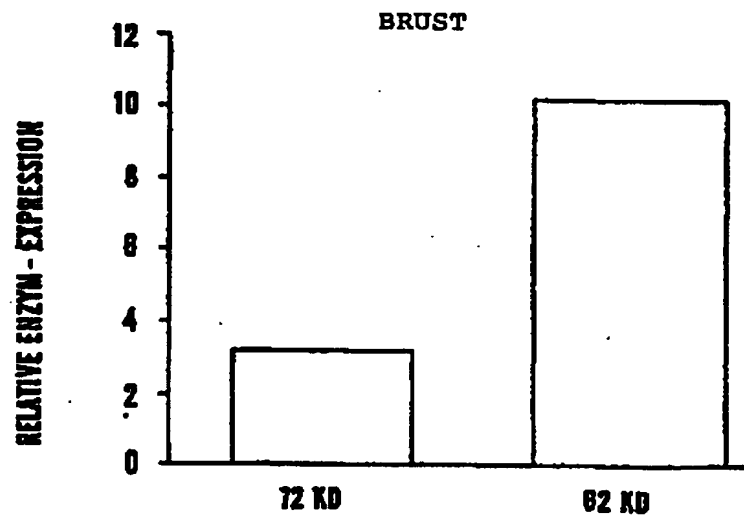


FIG. 6b



18.10.99

KOLON

BRUST

N

T

N

T



FIG.7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.